

MINISTERIE VAN MIDDENSTAND EN LANDBOUW

Bestuur voor Onderzoek en Ontwikkeling

Centrum voor Landbouwkundig Onderzoek – Gent

DEPARTEMENT ZEEVISSERIJ

Onderzoek van de fagocytosecapaciteit van mosselen (*Mytilus edulis*) in de nabijheid van de Belgisch kusthavens.

D. DECLERCK



Mededelingen van het Departement Zeevisserij
(Centrum voor Landbouwkundig Onderzoek – Gent)
Publicatie nr. 249 – D/1998/0889/4

SAMENVATTING

De methode voor de bepaling van de fagocytosecapaciteit bij mosselen (*Mytilus edulis*) werd onderzocht. Hierbij werd zowel voor de bemonstering als voor de uitvoering een protocol opgesteld. Er werd vastgesteld dat de ligging van de mosselen op de golfbreker de fagocytosecapaciteit in belangrijke mate beïnvloedt. De mosselen die zich achteraan en midden de golfbreker bevinden, verkeren door zuurstofgebrek bij eb, in een meer gestresseerde toestand. Er werd eveneens een vergelijkend onderzoek omtrent de fagocytosecapaciteit van mosselen in de nabijheid van de Belgische havens uitgevoerd. De impact van een niet adequaat milieu op de conditie van mosselen bleek groter te zijn in Nieuwpoort dan in de andere locaties langs de Belgische kust. Uit het onderzoek omtrent de invloed van Cd^{2+} op de fagocytosecapaciteit van mosselen kwam tot uiting dat de toevoeging van Cd^{2+} duidelijk tot een vertraging van de fagocytoseproces heeft geleid.

INLEIDING

De basis voor alle contaminant geïnduceerde pathologische veranderingen is: schade aan, of verstoring van levende processen op zowel moleculaire als subcellulaire niveaus. Bijgevolg is een detectie van deze veranderingen noodzakelijk om zo merkers te verschaffen voor de vaststelling van de schade. Indien deze schade aanhoudt, zal dit op termijn leiden tot celbeschadiging en pathologie met een eventuele achteruitgang in de gezondheid van de populatie.

Enerzijds hebben biomerkers een diagnostische waarde in relatie tot de opgelopen pathologische schade. Anderzijds zijn ze een maat voor blootstelling of biologische beschikbaarheid aan verschillende klassen van organische xenobiotica. Dit zijn vreemde stoffen die een invloed hebben op het functioneren van levende organismen. De biomarker aanpak biedt een krachtig middel voor de bewaking van het milieu en voor het leggen van verbanden met de oorzaken van de opgelopen schade. In dit verband is het lysosoom een van de celorganellen die frequent in de biomarker aanpak wordt bestudeerd. De lysosomale activiteit is een normaal proces in de intracellulaire vertering. Als het organisme aan stress onderhevig is, kan deze respons versneld worden. Op termijn kan dit leiden tot eliminatie van de cellulaire activiteit of met andere woorden tot celdysfunctie, wat een hoofdkenmerk is van vele ziekten. Bij blootstelling van lysosomen aan een bepaalde stressfactor zoals xenobiotica, worden hydrolytische enzymen geactiveerd en in het cytoplasma afgegeven. Het gevolg hiervan is een destabilisatie van het membraan, wat uiteindelijk resulteert in een toegenomen membraanfusie en dus grotere lysosomen. Lysosomale labiteit wordt gezien als een algemene biomarker voor celbeschadiging en autofaagfuncties van lysosomen in vis en weekdieren (Tremblay, 1997). Dit fenomeen werd eveneens door Köhler en medewerkers (1992) waargenomen.

Tremblay (1997) ging het effect na van de getijdencyclus op de lysosomale membraanstabiliteit in de spijsverteringsklier van *Mytilus edulis*. Bij de mosselen werd destabilisatie van het lysosomale membraan vastgesteld bij eb. De oorzaak voor de destabilisatie bleek de bloot-

stelling aan de lucht en het daarmee gepaard gaande tekort aan zuurstof te zijn. Lowe (1995) bestudeerde de schade aan de lysosomen van de granulocyten in *Mytilus galloprovincialis*. De mosselen waren afkomstig van de lagune van Venetië. De schade werd gecorreleerd aan een reeks van contaminanten, met behulp van de lysosomale membraanstabiliteit. Deze proef omvat de retentie van neutral rood binnenin het lysosomale compartiment van de granulocyten in functie van de tijd.

Carballal en medewerkers (1997) bestudeerden de celtypen van het bloed bij de mossel, *Mytilus galloprovincialis*. Naast het voorkomen van hyalinocyten (rode doorschijnende cellen met centrale kern, omgeven met een kleine hoeveelheid cytoplasma) worden ook granulocyten aangetroffen die voorzien zijn van granula en op basis van kleuring in drie klassen worden ingedeeld namelijk : acidofiele granulocyten, basofiele granulocyten en een derde soort waar beide soorten samen in een bloedcel aanwezig zijn. In onderhavige studie worden alle voorkomende granulocyten voor de bepaling van de fagocytosecapaciteit bij de mossel (*Mytilus edulis*) in aanmerking genomen.

MATERIAAL en METHODEN

In een eerste fase werd de invloed van het incubatiemedium, de incubatietijd en -temperatuur op de fagocytosecapaciteit van de mossel onderzocht. Dit onderzoek heeft elementen geleverd bij het uitwerken van een protocol voor de bepaling van de fagocytose bij de mossel. In een tweede fase werd enerzijds de invloed van de ligging van de mosselen op eenzelfde golfbreker en anderzijds de fagocytose bij mosselen afkomstig van vier verschillende locaties van de Belgische kust bepaald.

1 Onderzoek van het incubatiemedium

Bij het onderzoek omtrent de fagocytosecapaciteit van mosselen werden enerzijds het incubatiemedium Leibovitz L-15-AIMV voorzien van penicilline, heparine, 1ml mosselbloed en een overmaat gedode gistcellen en anderzijds het Phosphate Buffered Saline (PBS), een fysiologische oplossing van Oxoid (Code BR14a – Dulbecco A tablets) voorzien van 1ml mosselbloed en een overmaat gedode gistcellen, onderzocht. De mosselen waren afkomstig van een golfbreker te Oostende. De bemonstering, de bloedafname, de test om de vitaliteit van de hemocyten te bepalen en het aanmaken van de gebruikte gistcellensuspensie werden uitgevoerd volgens het bijgaand protocol.

2. Invloed van de incubatietijd en de incubatietemperatuur op de fagocytosecapaciteit van mosselen

De mosselen waren afkomstig van het midden van de linkerzijde van een golfbreker ter hoogte van Knokke en gedurende een achttal dagen in een aquarium bewaard. De temperatuur

van het aquariumwater bedroeg 13°C. Voor de bloedafname werd een steriele hypodermische spuit in de achterste sluitspier van de mossel gebracht. Er wordt circa 0,5ml bloed per mossel bekomen.

Bij het onderzoek naar de invloed van de incubatieduur en -temperatuur op de fagocytosecapaciteit werd een mengstaal van het bloed van 10 mosselen in een steriele gecoate falcon centrifugeerbuis van 15ml verzameld. Om klontering te voorkomen wordt de gevulde falcon buis gedurende 1 minuut op regelmatige wijze met de hand bewogen en omgezwenkt. Als cultuurmedium werd PBS gebruikt. Het verloop van de fagocytosecapaciteit werd gedurende 30 uur op regelmatige tijdstippen bepaald. Voor wat de invloed van de incubatietemperatuur op de fagocytosecapaciteit betreft werden vier temperaturen namelijk 4°C, 13°C, 20°C en 30°C onderzocht.

3. Onderzoek van de fagocytosecapaciteit en fagocytose index bij mosselen in relatie met de bemonsteringsplaats.

De mosselen waren afkomstig van één golfbreker, die vooraan(V), midden(M) en achteraan(A) bemonsterd werd. De mosselen werden gedurende zestig dagen in een aquarium op 13°C bewaard en op regelmatige tijdstippen (1,3,6,10,20,60 dagen) onderzocht. De proefnemingen werden uitgevoerd volgens de richtlijnen van het protocol.

4. Onderzoek van de fagocytose bij mosselen afkomstig van vier verschillende locaties van de Belgische kust.

De mosselen waren afkomstig van Nieuwpoort (eerste alleenstaande golfbreker, links van het staketsel); Oostende (eerste alleenstaande golfbreker, links van de havenheul); Blankenberge (eerste alleenstaande golfbreker, links van het staketsel) en Knokke (vijfde golfbreker bij Surfers Paradise, in de richting van Knokke). Voor de bemonsteringsplaats werd telkens geopteerd voor het midden van de linkerzijde van de golfbreker. De proefnemingen werden driemaal herhaald en werden uitgevoerd volgens de beschrijving in het protocol. Het doel van de experimenten was de invloed van de verontreiniging van het zeewater in de Belgische kusthavens op de conditie van de mosselen met hematologische methoden te onderzoeken.

5. Onderzoek van de fagocytosecapaciteit van mosselen blootgesteld aan 0,5µg Cd²⁺/l

Voor de proefneming werd gebruik gemaakt van twee aquaria, waarvan een gevuld is met zeewater dat 0,5µM cadmium bevat. Het andere aquarium fungeerde als blanco. Beide aquaria waren voorzien van zuurstoftoevoer. De temperatuur van het water bedroeg 16°C. De mosselen werden blootgesteld aan 0,5µgCd²⁺/l; dit is de concentratie die voorkomt in de havengeul van Oostende. Een tweetal bepalingen werden uitgevoerd. Een eerste bepaling vond plaats na 7 dagen, net voor het verversen van het milieu en een tweede bepaling na het verversen van het milieu en de toevoeging van een nieuwe dosis Cd²⁺. De bepaling van fagocytosecapaciteit werd uitgevoerd volgens de richtlijnen van het protocol.

RESULTATEN en BESPREKINGEN

1. Bij het uittesten van de twee incubatiemedia, het Leibovitz L-15-AIMV en het PBS kwam tot uiting dat alleen met de fysiologische oplossing PBS fagocytose wordt verkregen. Het gebruik van penicilline gedurende de incubatieperiode was hier niet noodzakelijk. Gedurende de incubatieperiode werd geen ontwikkeling van bacteriën waargenomen. Het mosselbloed, het PBS en de gedode gistcellen worden in de cultuurplaten kiemvrij aangebracht. Op het einde van de incubatieperiode was de vitaliteit van de granulocyten in beide cultuurmedia 95%.

2. Het verloop van de gemiddelde fagocytosecapaciteit en de gemiddelde fagocytose index in functie van de incubatietijd wordt in figuur 1 weergegeven. Er wordt een aanloophase, een snelle toename en een uitloophase onderscheiden. Er werd vastgesteld dat na 7 uur incubatie gemiddeld 71% van de granulocyten fagocyteerden. De standaardafwijking bedroeg dan 19,8. De incubatieperiode zal bij de verdere proefnemingen na 7 uur worden beëindigd.

Voor wat de invloed van de incubatietemperatuur op de fagocytose (figuur 2) betreft kwam tot uiting dat de fagocytose bij 4°C moeilijk op gang kwam, doch na 5 uur dezelfde was als bij de incubatie bij 13°C en 20°C. Na drie uur incubatie bij 30°C kon reeds een geleidelijke daling van de fagocytosecapaciteit worden waargenomen. Hieruit kan worden besloten dat de incubatietemperatuur best enkele graden boven de temperatuur van het zeewater kan worden uitgevoerd.

3. De fagocytose na 6 dagen bewaren in het aquarium was beduidend hoger in het midden en achteraan de golfbreker, dan vooraan de golfbreker (figuur 3). Dit kan verklaard worden door de stress die geïnduceerd wordt door het getij. De mosselen die afkomstig waren van achter en midden de golfbreker liggen bij eb langer droog waardoor een gebrek aan zuurstof ontstaat en zijn dus meer gestresseerd. Dit is in tegenstelling met de fagocytosecapaciteit na 60 dagen. De mosselen die afkomstig waren van vooraan fagocyteerden het best, terwijl de mosselen die afkomstig waren van achter en midden de golfbreker reeds uitputtingsverschijnselen vertoonden.

De fagocytose index (figuur 4) vertoonde nagenoeg hetzelfde verloop als de fagocytosecapaciteit (figuur 3). Na 60 dagen verblijf in het aquarium is het aantal gistcellen die gefagocyteerd hebben dubbel zo groot bij de mosselen die afkomstig zijn van de kop van de golfbreker. De vraag die hier kan gesteld worden is de volgende. Kan een stress situatie zowel leiden tot een verdrukking als tot een stimulering van het fagocytoseproces. Wijst een grotere fagocytosecapaciteit en -index op een beter immuunsysteem of niet. Uit het experiment kwam naar voor dat een stress situatie, zoals het lange tijd droog liggen van de mossel aan de lucht gedurende eb, bij aanvang in een grotere fagocytosecapaciteit resulteert, maar gedurende het bewaren snel uitputtingsverschijnselen vertoont met een sterk verminderde fagocytosecapaciteit.

4. Het vergelijkend onderzoek omtrent de fagocytosecapaciteit en de fagocytose index van mosselen in de nabijheid van de Belgische kusthavens werd opgenomen in figuur 5. Het aantal levende granulocyten in het mosselbloed bedroeg in Nieuwpoort, Oostende en Knokke gemiddeld circa 87%. In Blankenberge werd gemiddeld een hoger aantal bepaald, namelijk 92%. Het verloop van de fagocytosecapaciteit en fagocytose index is nagenoeg dezelfde in de locaties Blankenberge en Knokke en in mindere mate in Oostende, waar hogere waarden op het einde van de incubatie periode werden bekomen. Bij de Nieuwpoortse mosselen werden gedurende gans de incubatie periode hogere waarden voor de fagocytose opgetekend. Volgens Peeters(1991) kan een stress situatie zowel tot een verdrukking als tot een stimulering van het fagocytoseproces leiden. Hieruit kan afgeleid worden dat de impact van de bevuilding op de conditie van de mosselen, groter is in Nieuwpoort dan in de andere locaties.

5. De resultaten van onderzoek omtrent de invloed van Cd^{2+} op de fagocytosecapaciteit bij mosselen zijn in figuur 6 opgenomen. Vóór het verversen is het verschil in fagocytosecapaciteit tussen de blanco en de met Cd^{2+} besmette mosselen duidelijk merkbaar. Gedurende de incubatieperiode herstellen de granulocyten van de besmette mosselen zich goed. Na het verversen en toevoeging van een extra dosis Cd^{2+} daalde de fagocytosecapaciteit tot net boven zero. Gedurende de incubatieperiode herstelde de fagocytosecapaciteit zich zeer moeilijk. De toevoeging van Cd^{2+} heeft duidelijk geleid tot een vertraging van de immuun respons van de granulocyten bij mosselen.

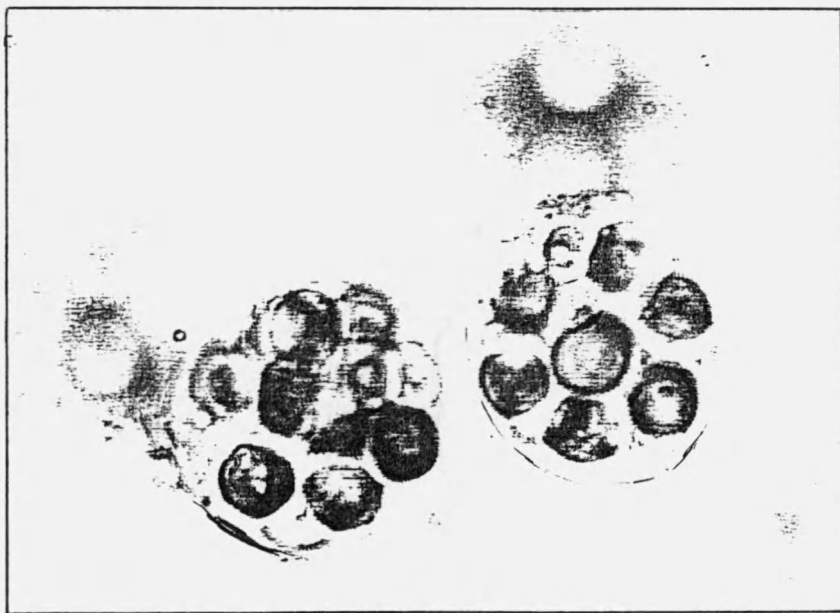
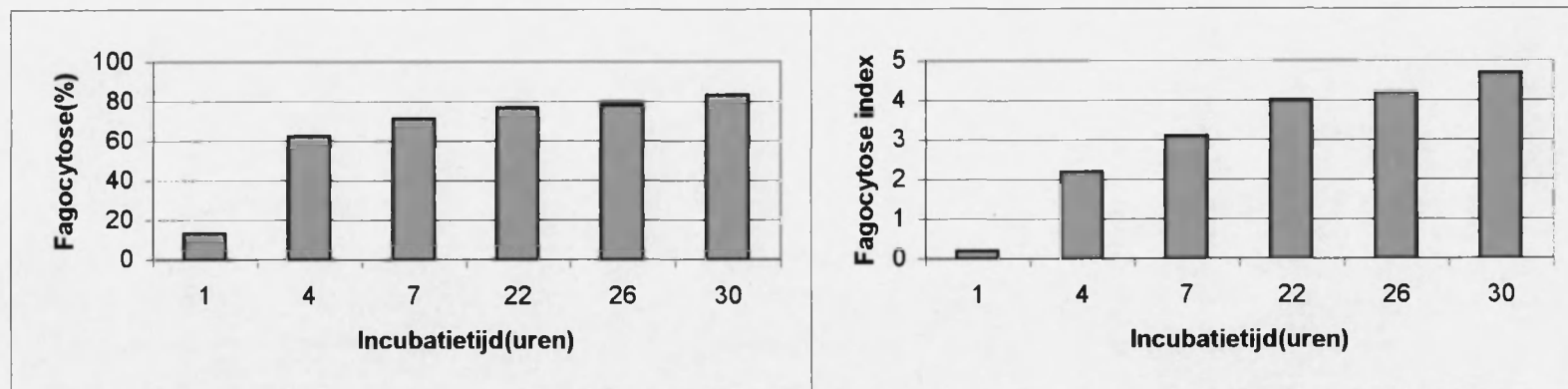
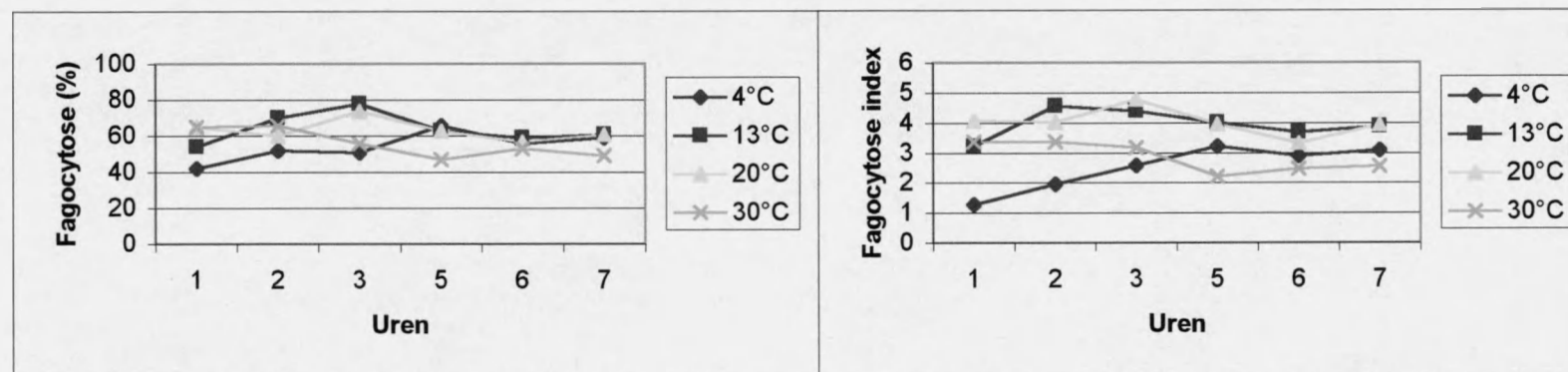


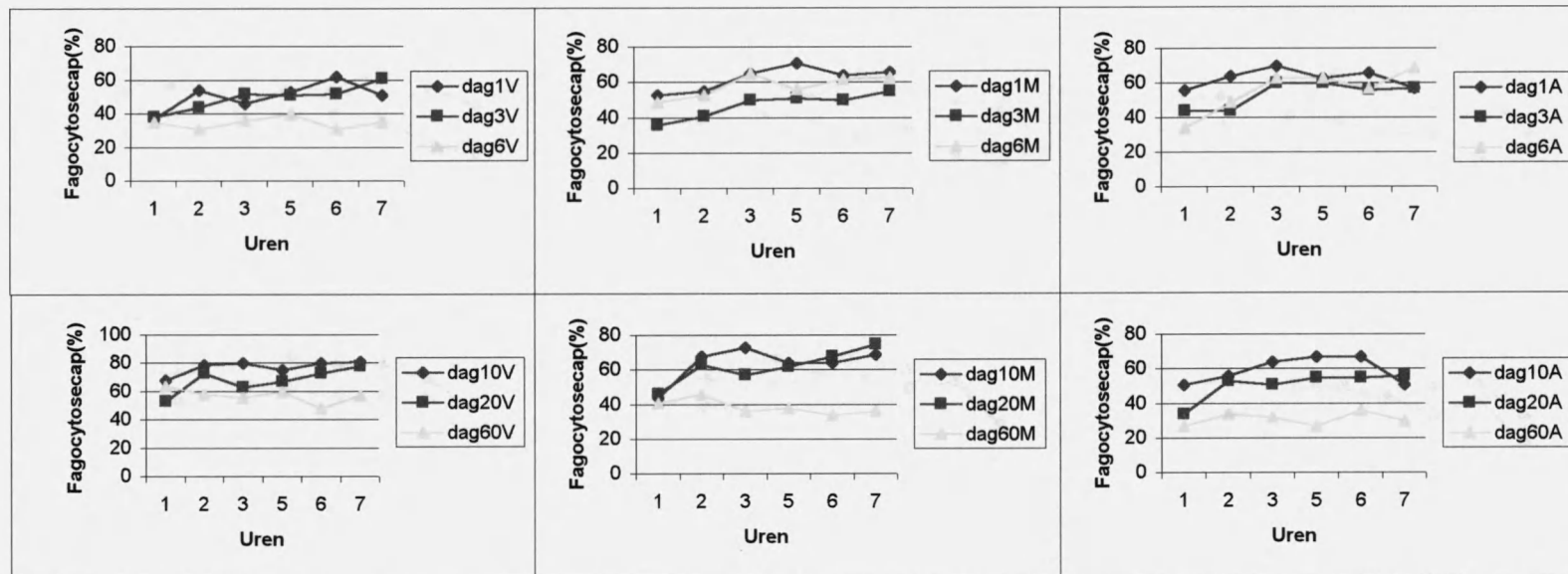
Foto : Fagocytose van gistcellen door granulocyten van mosselbloed



Figuur 1: Verloop van de fagocytosecapaciteit en fagocytose index in functie van de incubatietijd.



Figuur 2 : Verloop van de fagocytosecapaciteit en fagocytose index in functie van de temperatuur.

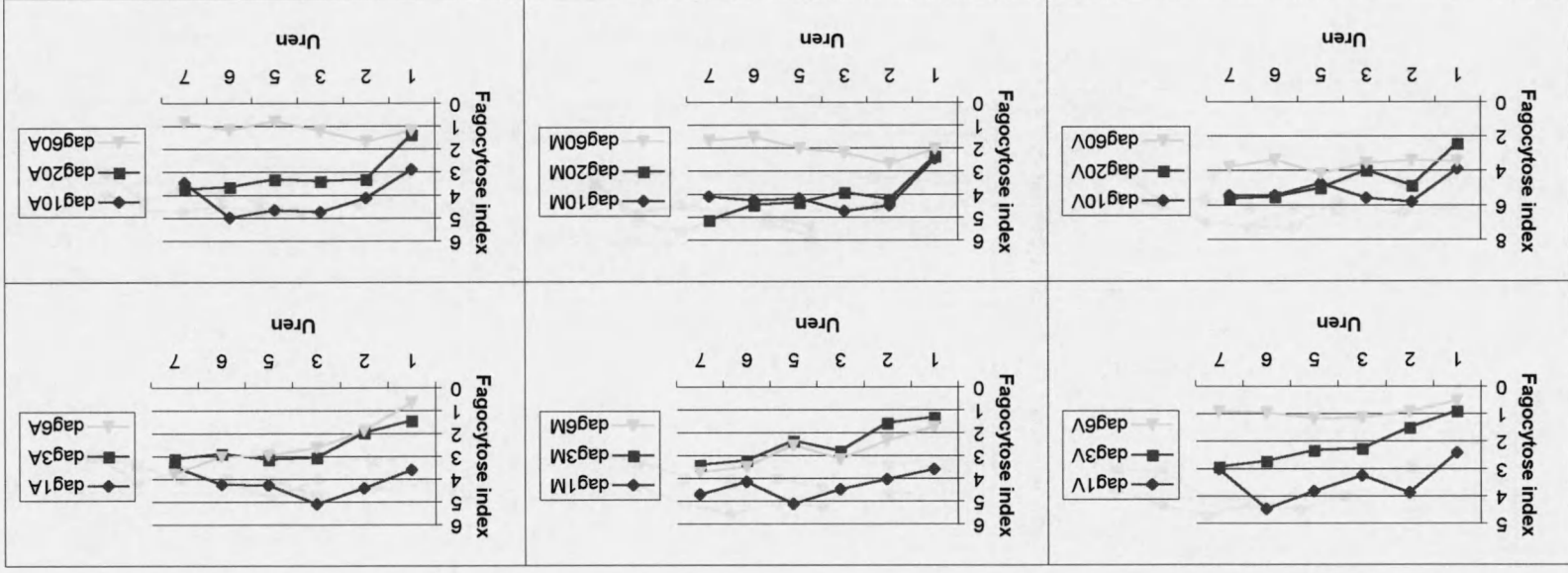


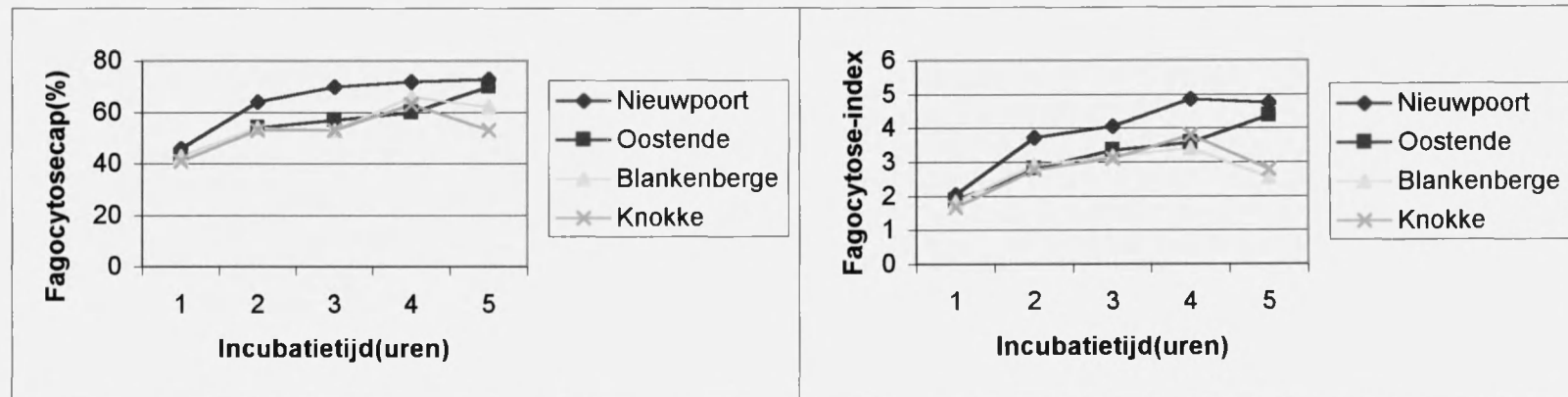
Figuur 3 : Evolutie van de fagocytosecapaciteit bij mosselen in relatie met de bemonsteringsplaats op de golfbreker en het bewaren in aquarium(13°C)

V=vooraan of kop van de golfbreker
M=midden van de golfbreker
A=achteraan of begin van de golfbreker

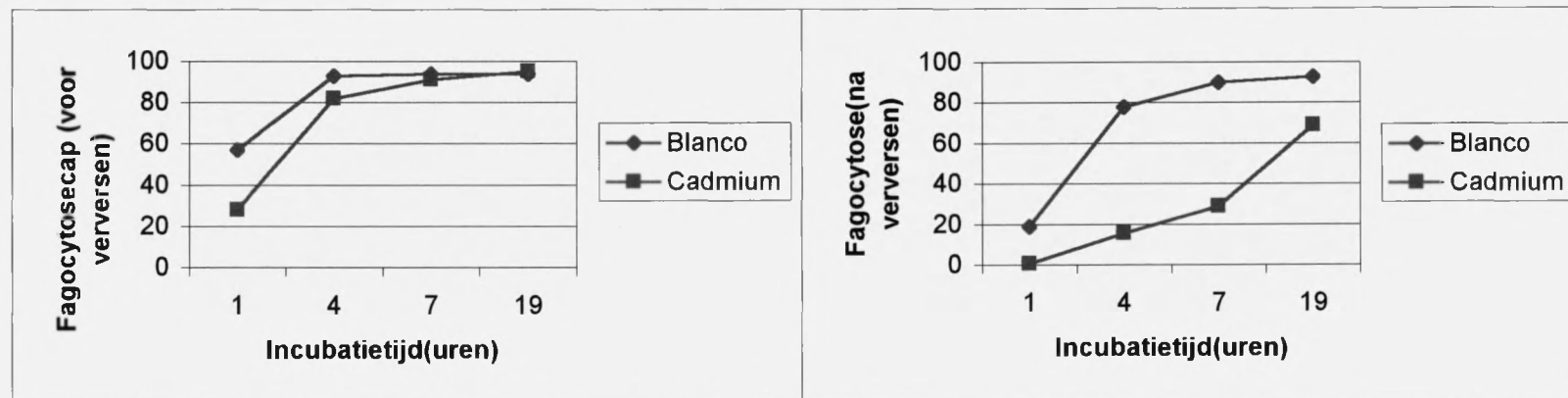
V=vooraan of kop van de golfbreker
M=midten van de golfbreker
A=achteraan of begin golfbreker

Figuur 4 : Evolutie van de fagocytose index bij mosselen in relatie met de bemonsteringsplaats op de golfbreker en het bewaren in aquarium(13°C)





Figuur 5 : Verloop van de fagocytosecapaciteit en fagocytose-index bij mosselen afkomstig van diverse locaties langs de Belgische kust



Figuur 6 : Verloop van de fagocytosecapaciteit bij mosselen vóór en na het verversen met cadmium voorzien zeewater

PROTOCOL

- **Bemonstering.**

De bemonsterde mosselen worden zo aseptisch mogelijk in plasticen zakken verzameld. Het tijdstip, het getij, de temperatuur van de lucht en het zeewater, de plaats van bemonstering op de golfbreker worden genoteerd. In het laboratorium worden de mosselen van de klasse 40-45mm gereinigd in zeewater en voor het verder onderzoek in de koelkast of in het aquarium bewaard.

- **Bloedafname.**

De mossel wordt met een fijne spatel, tot ongeveer halweg de ventrale zijde geopend. Een steriele hypodermische spuit van 1ml wordt in de achterste sluitspier van de mossel gebracht. Er wordt circa 0,4 ml bloed per mossel bekomen. Het bloed van tien mosselen wordt verzameld in een steriele gecoate falcon centrifugeerbuis van 15ml. Om klontering te voorkomen wordt de gevulde falcon buis circa 1 minuut op regelmatige wijze met de hand bewogen en omgezwinkt.

- **Vitaliteitstest**

In een vakje van een gecoate cultuurplaat (cell Wells multiwellculture plates, Corning, cat. Nr. 25850), wordt 30µl celsuspensie met 30µl trypaanblauw (Gibco BBL, cat nr 15250-020) vermengd. Na het vermengen van beide suspensies wordt een rustpose van 5 minuten ingebouwd. De gekleurde celsuspensie wordt met behulp van de telkamer van Kova (Kova slide 10, Boehringer Mannheim, cat. nr. 087144) microscopisch (vergroting x 400) onderzocht. De bloedcellen die de blauwe kleur hebben opgenomen worden als dood genoteerd.

Deze techniek heeft ook zijn toepassing bij de bepaling van de fagocytose. Na het fagocyteren wordt 30µl uit de cultuurplaat vermengd met 30µl trypaanblauw oplossing. De gefagocyteerde gistcellen blijven geel, terwijl de overige gistcellen de blauwe kleur opnemen.

- **Aanmaken van gistcelsuspensie met bakkersgist (*Saccharomyces cerevisiae*)**

Voor het bekomen van een nieuwe gistcultuur wordt het LB-medium (Gibco BBL, nr. 12780-045) met bakkersgist geënt. Voor de vermenigvuldiging van de gistcellen wordt een schudapparaat gebruikt. De incubatieduur en -temperatuur bedroegen respectievelijk 15 uur en 20°C. Een hoeveelheid van het LB-medium met gekweekte gistcellen wordt overgebracht in een centrifugeerbuis (Nunc Inc., cat. nr. 374632) en 10 minuten bij 21°C afgecentrifugeerd bij 1700t/min. De neergeslagen gistcellen worden driemaal gewassen met 10ml PBS (Phosphate saline, Dulbecco's Formula Modified, car. Nr 10010-015) Uiteindelijk worden de gistcellen in 25ml PBS gebracht en met 25ml congorood vermengd. De stockoplossing van congorood wordt verkregen door 100mg congorood (Sigma, cat.nr. C6277) in 100 ml water op te lossen. De gistcellen worden tweemaal gewassen om de overtollige kleurstof weg te werken en daarna gesteriliseerd. De gewassen gistcellen worden in PBS opgeslagen en in de koelkast bij 4°C bewaard. De bewaarduur van de gesteriliseerde gistcellen is minimum 14 dagen.

- **Bepaling van de fagocytosecapaciteit en de fagocytose index**

Het mosselbloed wordt verdeeld over de gecoate steriele cultuurplaten. In elk rond vakje van de cultuurplaat wordt 2ml PBS; 1ml mosselbloed en 50 tot 100µl gedode gistcellen gepipeerd. De concentratie van de gedode gistcellen (± 35 gistcellen per granulocyt) moet gedurende de incubatieperiode steeds in overmaat aanwezig te zijn. Wanneer de fagocytose groot is (>10 gistcellen per granulocyt) moeten de cultuurplaten na 4 uur aangevuld worden met een tweede hoeveelheid gistcellen.

De incubatie wordt uitgevoerd in 5 vol% CO₂ gedurende 7uur bij kamertemperatuur. Op regelmatige tijdstippen wordt de fagocytosecapaciteit en de fagocytose index bepaald. Hiervoor worden 30µl medium met 30µl trypaan in de telkamer van Kova aangebracht. Met behulp van een lichtmicroscop worden er 100 levende granulocyten onderzocht. Het aantal cellen die gefagocyteerd hebben en de hoeveelheid gistcellen die per levende granulocyt worden opgenomen, worden genoteerd.

BESLUIT

- Het incubatiemedium speelt een belangrijke rol in het fagocytoseproces bij mosselen. Het L-15-AIMV medium blijkt een negatieve invloed op fagocytose uit te oefenen, terwijl in aanwezigheid van PBS de granulocyten sneller fagocyteerden.
- Er werd een grote individuele spreiding vastgesteld. Bij elk experiment dient men een bloedstaal samen te stellen die afkomstig is van minstens tien mosselen.
- De optimale incubatietemperatuur ligt tussen 10°C en 20°C, wat incubatie bij kamertemperatuur mogelijk maakt.
- Bij een bewaarproef van mosselen, die 60 dagen in beslag nam, werd vastgesteld dat de ligging van de mosselen op de golfbreker een invloed heeft op de fagocytosecapaciteit. De mosselen die zich achteraan en midden de golfbreker bevinden, verkeren door zuurstofgebrek bij eb in een meer gestresseerde toestand.
- Uit het vergelijkend onderzoek omtrent de fagocytosecapaciteit van mosselen in de nabijheid van de Belgische havens kon worden vastgesteld dat de impact van een niet adequaat milieu op de conditie van mosselen groter is in Nieuwpoort dan in andere locaties.
- Uit het onderzoek omtrent de invloed van Cd^{2+} op de fagocytosecapaciteit van mosselen kwam tot uiting dat de toevoeging van Cd^{2+} duidelijk tot een vertraging van de fagocytoseproces heeft geleid.

REFERENTIES

Köhler A, et al. (1992). Ultrastructural and cytochemical indices of toxic injury in dab liver. Mar. Ecol. Progr. Ser., 91, 141.

Lowe DM, Fossato VU and Depledge MH (1995). Contaminant-induced lysosomal membrane damage in blood cells of mussels *Mytilus galloprovincialis* from the Venice Lagoon: in vitro study
Mar. Ecol. Progr. Ser.; 129,189-196.

Moore MN (1996). Protocol of the use of the molecular probe neutral red in mussel blood. Draft report of the ICES special meeting on the use of liver pathology of flatfish for monitoring biological effects of contaminants; 22-25 October 1996, Weymouth (UK)

Tremblay R, Pellerin-Massicotte J (1997). Effect of the tidal cycle on lysosomal membrane stability in the digestive gland of *Mya arenaria* and *Mytilus edulis*L. Comparative Physiology A; 117 (1), 99-104.

Carballal M, et al. (1997). Hemolymph cell types of the mussel *Mytilus galloprovincialis*

